

Tumor-specific antibodies and antigen

Publication number: US5614373

Publication date: 1997-03-25

Inventor: STAHEL ROLF (CH)

Applicant: MERCK PATENT GMBH (DE)

Classification:






- **International:** **C07K16/28; C07K16/30; C12P21/08; A61K38/00; C07K16/18; C12P21/08; A61K38/00; (IPC1-7): G01N33/574; C07K16/00**

- **European:** C07K16/28A; C07K16/30D

Application number: US19950403806 19950316

Priority number(s): DE19924231066 19920917; DE19934314870 19930505; WO1993EP02042 19930730

Also published as:

 WO9406929 (A1)
 EP0662147 (A1)
 EP0662147 (A0)
 CA2144750 (A1)
 EP0662147 (B1)

more >>

Report a data error here

Abstract of **US5614373**

PCT No. PCT/EP93/02042 Sec. 371 Date Mar. 16, 1995 Sec. 102(e) Date Mar. 16, 1995 PCT Filed Jul. 30, 1993 PCT Pub. No. WO94/06929 PCT Pub. Date Mar. 31, 1994 The invention relates to a novel epitope of 180,000 daltons for the NCAM antigen and a monoclonal antibody, SEN7, directed against this antigen, and their use in diagnosis and therapy of small-cell carcinoma of the lung. The antibody SEN7 reacts significantly more selectively than previously known antibodies with cells of small-cell carcinoma of the lung, and binds with high avidity. In particular, no reaction occurs with leucocytes or healthy kidney or lung epithelial cells. The novel antigen is dominantly expressed by cells of small-cell carcinoma of the lung with a high copy number.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-504088

(43) 公表日 平成8年(1996)5月7日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		9358-4B	
A 6 1 K 39/395	A D U T	9284-4C	
39/44		9284-4C	
		9281-4B	C 1 2 N 15/00
		7729-4B	5/00
			C B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-507727
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)7月30日
 (85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)3月16日
 (86) 国際出願番号 P C T / E P 9 3 / 0 2 0 4 2
 (87) 国際公開番号 W O 9 4 / 0 6 9 2 9
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)3月31日
 (31) 優先権主張番号 P 4 2 3 1 0 6 6 . 0
 (32) 優先日 1992年9月17日
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)
 (81) 指定国 E P (A T , B E , C H , D E ,
 D K , E S , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M
 C , N L , P T , S E) , A U , C A , J P , U S

(71) 出願人 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ
 ト ベシュレンクテル ハフトング
 ドイツ連邦共和国 デー—64293 ダルム
 シュタット フランクフルター シュトラ
 ーセ 250
 (72) 発明者 シュターヘル、ロルフ
 スイス国 ツェーハー—8127 フォルヒ
 ヘネンシュトラーセ 48
 (74) 代理人 弁理士 若林 忠

(54) 【発明の名称】 腫瘍特異性抗体および抗原

(57) 【要約】

本発明は、NCAM抗原のための180、000ダルトンの新規のエピトープおよびこの抗原に対するモノクローナル抗体、SEN7、および肺の小細胞癌腫の診断および治療におけるこれらの使用に関する。抗体SEN7は、既に公知の抗体に較べて有意に優れた選択性で肺の小細胞癌腫の細胞と反応し、高い親和性で結合する。とくに、白血球および健康な腎臓または肺上皮細胞と反応しない。新規の抗原は、多数のコピー数で肺の小細胞癌腫の細胞によって優勢に発現される。

【特許請求の範囲】

1. SEN7 と称するネズミモノクローナル抗体。
2. 名称SEN7. 2 a. 4 および寄託番号DSM ACC 2050を有し、請求項1に記載のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系。
3. 請求項1に記載の抗体によって結合されることを特徴とする肺の小細胞癌腫の細胞からの抗原。
4. 分子量180、000を有する膜結合糖タンパク質であることを特徴とする請求項3に記載の抗原。
5. 請求項1に記載のモノクローナル抗体からの超可変部を含むことを特徴とするネズミ超可変部およびヒト枠組み構造領域および定常部を有するヒト化抗体。
。
6. 抗体成分として請求項1または5に記載の抗体を含むことを特徴とする抗体抱合体。
7. 肺の小細胞癌腫の治療および／または診断のための調製物の製造のための請求項1または5に記載の抗体または請求項6に記載の抗体抱合体の使用。
8. 肺の小細胞癌腫の治療および／または診断のための請求項1または5に記載の抗体または請求項6に記載の抗体抱合体の使用。

【発明の詳細な説明】

腫瘍特異性抗体および抗原

本発明は、新規の腫瘍抗原、この抗原に対する抗体および肺の小細胞癌腫の診断および治療におけるそれらの使用に関する。

肺の小細胞癌腫は、早期転移形成をする傾向にある。この理由から、外科的、放射線医学的または化学療法的な治療は、多くの場合、暫定的な治療にしかならない。退行において、前に有効であった例えば放射線照射および化学療法などの治療に対しての治療抵抗が、併発症となって現れる。このために、将来は、原発性腫瘍の従来の治療の後の患者に対して抗体または抗原-抱合活性物質を用いる特異的な後療法をすることが考えられてきた。標識抗体もまた、画像処理による転移のデモンストレーションのためにまたは組織学的手法による腫瘍組織の検査のために用い得る。

肺の小細胞癌腫の細胞によって発現される多くの抗原が公知である。専門家会議における合意（肺癌抗原に関する第一および第二回国際ワークショップ、Brit. J. Cancer、63 (suppl.)、10-19、1991およびJ. Nat. Cancer Inst.、83、609-612、1991）によると、それらは7グループに分けられる。これらの抗原に対す

る抗体もまた公知である。動物モデルにおいて、これらの抗体は、腫瘍細胞の局所限定のために時に用いられてきた。肺の小細胞癌腫の重要な公知の抗原には、神経細胞の付着分子（神経細胞付着分子、NCAM）およびクラスター2およびw4の抗原がある。他には、ムチン、ルイス^x抗原およびABO式血液型の抗原がある。NCAMおよびクラスターw4抗原に対する抗体はまた、白血球に結合する。クラスター2抗原に対する抗体はまた、上皮組織に結合する。このために、このタイプの抗体は、免疫学的腫瘍療法に望ましいが全身的適用には不適である。特定の抗原に対する高い親和性は、腫瘍組織において抗体が高度に濃縮されることからさらに有用である。

肺の小細胞癌腫の細胞に対する相対的特異性を有する今日までに見出だされた抗原およびこれらの抗原に対する抗体は、十分に選択的ではない。これらを用い

てなされる肺の小細胞癌腫の細胞の検出は十分に信頼できない。この疾患の免疫学的治療の方法には、既に公知の腫瘍抗原の特異性および既に公知の抗体の親和性はまた、不適當である。本発明の目的は、肺の小細胞癌腫の診断および治療を促進するために、この癌腫の新規の腫瘍抗原およびこれらの抗原に対する抗体を提供することである。詳細には、その目的は多数のコピーが優勢に、できれば腫瘍においてのみ発現される

ように改良された抗原を提供することにある。このタイプの抗原に対する抗体は高親和性によって識別されるはずである。

肺の小細胞癌腫の細胞表面の新規抗原が今見出だされ、これは腫瘍細胞の既に公知の抗原よりも有意により特異的であり、とくに白血球または健康な腎臓または肺の上皮細胞上では生じないことが特徴づけられている。新規の抗原は、肺の小細胞癌腫の細胞によって多数のコピー数で優勢に発現される。本発明によると特異的に強い親和性で新規の抗原に結合するモノクローナル抗体が提供される。

したがって、本発明は、SEN 7 と称されるネズミモノクローナル抗体、それにまたモノクローナル抗体 SEN 7 を分泌する SEN 7. 2 a. 4 という名称および寄託番号 DSM ACC 2050 を有するハイブリドーマ細胞系に関する。

本発明はさらに、ネズミ超可変部およびヒト枠組み溝造領域および定常領域を有し、モノクローナル抗体 SEN 7 からの超可変部を含むことを特徴とするヒト化抗体に関する。

本発明はまた、とくにヒト由来であり、肺の小細胞癌腫の細胞からのものであって、抗体 SEN 7 によって結合されることを特徴とする抗原に関する。

本発明はまた、とくに、トキシン、放射性同位元素

および／または標識剤との抱合体であって、抗体成分として抗体 SEN 7 または抗体 SEN 7 の超可変部を有するヒト化抗体を含むことを特徴とする抗体抱合体に関する。

本発明はさらに、抗体 SEN 7 または抗体 SEN 7 の超可変部を有するヒト化

抗体および／または抗体成分として抗体SEN7を含む抗体抱合体または抗体SEN7の超可変部を有するヒト化抗体の、肺の小細胞癌腫の治療および／または診断のための調製物の生産のための使用に関する。

本発明はさらに、抗体SEN7または抗体SEN7の超可変部を有するヒト化抗体および／または抗体成分として抗体SEN7を含む抗体抱合体または抗体SEN7の超可変部を有するヒト化抗体の、肺の小細胞癌腫の治療および／または診断のための使用に関する。

通常、モノクローナル抗体は、齧歯動物細胞から、とくにマウスの細胞から得ることができる。これらの抗体は、ヒトにおけるインビボ使用で望ましくない免疫反応を生じる。これらの望ましくない免疫反応を避けるために、ヒトにおけるインビボ使用を目的とする抗体はこれらをもはや外来物として認識しないように修飾される。これらの目的のための通常の修飾法には、CDR移植 (Janes, P. T., et al, Nature 321, 14-17, 1986およびKettleborough, C. A., et al, Protein Engineering 4, 773-783, 1991) が含まれる。さらなる可能な修飾法は当業者

に公知である。このタイプの修飾抗体を、本発明においてはヒト化抗体と称する。

抗体の分析的検出を可能にするために、これらを標識物質 (トレーサー) と結合させる。例えば、抗体は放射性同位体を用いて標識することができる。これらの目的には、イットリウム、レニウムおよびテクネチウムの放射性同位体、とくにI 125およびI 131、さらにまたIn 111が通常用いられる。アイソトープ標識の方法および標識に適する他の放射性同位体は、当業者に公知である。これらの放射性標識物質の他に、さらなる非同位体標識物質が当業者によく知られている。これらはしばしば分析的作業において好まれる。例えば、フルオレセインなどの蛍光性物質または代わりにペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼなどの酵素などを用いて標識することも可能である。適当な蛍光物質または酵素の選択および必要な検出方法は当業者に公知である。多くの場合、標識物質を抗体に直接に結合させずに、追加の強力な結合リガンドを用いて間接的に結

合させる方が便利である。ビオチン／アビジンまたはビオチン／ストレプトアビジンの組み合わせが、とくにこの目的に適していることが証明されている。

このタイプのリガンドの選択および必要な結合方法

は当業者に公知である。本発明においては、これらの例に対応して、標識物質という用語は、直接標識法に用いられる標識物質と結合リガンドを含む間接標識法において用いられる組み合わせの両方を意味すると理解されるべきである。

免疫学的療法によっては、抗体の生物学的作用は直接に利用される。他の免疫学的療法においては、疾患組織を傷害することを意図する化合物を追加的または時に排他的に用いる。この傷害は例えば、I 131またはI 125などのアイソトープの放射性活性によって、またはリシンAまたはゲロニンなどの植物または細菌性トキシンおよび細胞増殖阻止剤を含む細胞毒性物質によってもたすことができる。さらなる適当な放射性同位体および細胞毒性物質は、当業者に公知である。これら物質は全て、本発明においてはトキシンという用語で表す。抗体はトキシンを腫瘍などの作用予期部位に運び、そこで疾患細胞を破壊する。

本発明の抗原およびこの抗原に対する抗体を調製するための実験にマウスを免疫した。免疫原は、予めノイラミニダーゼで処理しておいた肺の小細胞癌腫の細胞を用いた。ヒト細胞系SW2の細胞を、とくにこの目的のために用いた。得られるネズミモノクローナル抗体を調べている間に、アイソタイプIgG1の抗体を分泌する細胞系が見出だされ、これをSEN7と称

した。この抗体は、調べた全ての肺の小細胞癌腫細胞系(15)と反応した。肺の単層細胞癌腫(3)および肺の腺腫(3)の細胞系では反応は認められなかった。この抗体は以前には知られていなかった神経細胞付着分子(NCAM)のエピトープに特異的で、既知のグループのいずれにも属さないことが明らかにされた。抗体SEN7を分泌する細胞系は、SEN7. 2a. 4の記述で、ドイツ微生物および細胞カルチャー収集機関(Brunswick、ドイツ)に寄託してある(寄託番号DSM ACC2050)。

モノクローナル抗体SEN7によって認識されるNCAM分子の新規エピトー

プの特徴は、以下に記される。抗体SEN7もまた特徴づけされる。さらなる実験的詳細は実施例に示される。抗体の産生および分離、抗体および抗原の特徴づけおよび放射性同位体の誘導のための標準的生化学的方法は当業者に公知であり、例えばAntibodies, a Laboratory Manua (Harlow and Lane (eds)、Cold Spring Harbor Laboratory、1988)などの参考書および総説に記述がある。通常の変法についてもこれに記述されている。

マウス(BALB/c)の免疫のために、肺の小細胞癌腫の細胞(細胞系SW2)をノイラミニダーゼで処理した。このタイプの方法の詳細および適当な免疫方式については、例えばInt. J. Cancer、35、11-17

、1985およびCancer Research 48、412-417、1988)などの文献から当業者に公知である。細胞系P3X63Ag8.653を融合相手に用いた。

融合細胞を培養して、クローニングして、クローンを再び培養した。産生された抗体を間接的免疫蛍光法を用いて未処理およびノイラミニダーゼ処理したSW2細胞について調べた。抗体が骨髄からの細胞または白血球と反応しなかった細胞系をさらに選択した。抗体の細胞との結合を蛍光標識をした二次抗体を用いて検出することができる。

このようにして単離した抗体SEN7をタイプ分けして、IgG1アイソタイプに属することが明らかになった。

SEN7を産生する細胞をホローファイバーシステムで培養した。抗体を、プロテインAカラム上でのアフィニティークロマトグラフィーによって培養濾液から精製した。

抗体SEN7によって認識される抗原の特徴づけを行うためにウエスタンブロット分析を行った。肺の小細胞癌腫に由来し、抗体SEN7と反応する細胞系OH3を、抗原源として用いた。細胞の表面抗原を、種々のプロテアーゼインヒビターの混合物の存在下で洗剤処理することによってそれぞれ抽出した。抽出物を、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下でポリアクリルアミ

ドゲル上の電気泳動を用いて公知の方法によって分離した。このようにして分離

した画分は、抗体SEN7と反応しなかった。このために、分離した画分を公知の方法でまず尿素を用いて復元（再生）させた。分子量180,000ダルトンを有する明瞭なタンパク質バンドが、この処理後に見られた。このバンドは、細胞系SW2およびOH3の場合に非還元条件下で存在した。これは一次抗体なしの陰性対照においては存在しなかった。

さらに抗原の特徴づけを行うために、SW2細胞をツニカマイシンの存在下で培養した。このプロセスにおいて、窒素結合炭水化物の生合成が阻害される。このタイプの培養細胞のFACS can分析は、これらが抗体SEN7と反応しなかったことを示した。したがって、抗体SEN7が結合するエピトープはアスパラギン結合オリゴ糖を含む。抗原はしたがって糖タンパク質である。

抗体の特徴づけを行うために、SW2細胞の連続希釈物をアイソトープ標識した抗体を用いて処理した。次いで、遊離および細胞結合した抗体含量を放射能測定によって決定した。データ分析によって、抗体はアフィニティー定数、 $K_a = 2 \times 10^9 M^{-1}$ で結合し、細胞当たり約200,000個の結合部位が存在することが示された。

抗体SEN7の結合特異性を決定するために、間接的免疫蛍光法によって種々の癌腫の生細胞について調べた。調べた肺の小細胞癌腫の全16細胞系で反応は陽性であった。三つの細胞系（U1752、HOTZおよびLX1、扁平上皮細胞癌腫または肺の未分化癌腫）において染色が認められなかった。同じことはさらに調べた三つの細胞系（A125、SLC52およびA549、腺癌）にも当てはまる。

白血球および末梢血リンパ球の検査によって、抗体はこれらの細胞とは結合しないことが示された。さらに赤血球凝集反応によって、赤血球との結合も起きないことが確認された。抗原グループのクラスター1およびクラスターw4に対する非選択的に白血球およびリンパ球と反応する公知の抗体に対して、本発明による抗体はこれらの細胞と反応しない。本発明によるNCAMのエピトープは、このようにこれらの細胞の表面に存在しない。

腫瘍および健康組織の組織試料を、公知のイムノペルオキシダーゼ染色によっ

てさらに調べた。肺の小細胞癌腫または類癌腫は陽性反応を示した（それぞれ7試料中6試料、3試料中2試料）。調べた他の腫瘍組織（腺癌、乳癌、結腸癌、腎癌腫およびリンパ腫）は全て反応を示さなかった。個々の細胞タイプは、健康な甲状腺、副腎、筋肉、睾丸、末梢神経、脊髄、脳お

よび下垂体組織において陽性に反応した。皮膚、気管支、肺、腎臓、肝臓、大腸、リンパ節および脾臓からの健康な組織の反応は完全に陰性であった。

抗体の分布を、画像処理および治療的使用のためのモデル系として異種移植片を有するマウスにおいて決定した。このために、細胞系SW2の洗浄細胞107個をそれぞれマウスに皮下注射した。腫瘍が約100mgの重量に達したら直ちに、検査を始めた。この時点で、等量のSEN7抗体（ ^{125}I -標識）および対照としてのMG-1抗体（ ^{131}I -標識）の混合物を動物に注射した。抗体SEN7と同様に対照抗体はクラスIgG1に属する。二つの抗体の臓器分布を数日間にわたって調べた。抗体は血液循環から腫瘍に吸収された。すなわち、第3日以降、血液中の3～5倍の高濃度の抗体SEN7が腫瘍中で測定された。この吸収は特異的であった。すなわち、腫瘍中の濃度に比較して、肝臓（非特異的分解反応部位）の濃度は15～20分の1と低かった。注射用量は、臓器の重量に対して、多くても32%であった。

さらに詳述することなく、当業者は以上の記述を用いて最大範囲に本発明を利用できると考えられる。したがって、好ましい特定の実施態様は、単に説明を目的とするものであって、決して開示の限定を意図するものではない。

上記および下記に引用した全出願、特許および刊行物および対応出願の1992年9月17日受理のドイツDE42 31 066および1993年5月5日受理の43 14 870の全開示を、参考文献としてここに付す。

[実施例]

次の略語を用いる。

PBS： 磷酸塩緩衝生理食塩水溶液（137mM NaCl、2.7mM KCl、8mM Na_2HPO_4 、1.5mM KH_2PO_4 ）

BSA : ウシ血清アルブミン

TCA : トリクロル酢酸

DMSO : ジメチルスルホキシド

DMF : ジメチルホルムアミド

TBS緩衝液 : 1M NaClを含むトリス緩衝液 (50mM、pH7.3)

とくに記載がなければ、ハイブリドーマ細胞系の培養には次の添加物を有するRPMI 1640培地を基礎にした培地を用いる。すなわち、10% (v/v) ウシ胎児血清、10% (v/v) 補足H1 (BM-Condimed (登録商標)、ベーリンガー・マンハイム社)、1% (v/v) L-グルタミンおよび1% (v/v) のインシュリン-オキサロ酢酸-ピルビン

酸溶液 (1.5mg シス-オキサロ酢酸、0.5g ピルビン酸ナトリウムおよび2000単位のインシュリンを80mlの水に加えて、次いでHClを溶液が透明になるまで加えて (pH3~4)、溶液を水で100mlにする)。

インキュベーションは、とくに記載がなければ、室温 (RT: 15~28℃) で行う。

[実施例1]

抗体SEN7を分泌するハイブリドーマ細胞系SEN7.2a.4の調製

マウス (BALB/c) の免疫をStahel R.A.、et al、Int. J. Cancer 35、11-17、1985の方法によって行う。肺の小細胞癌腫の細胞 (細胞系SW2、Dana Farber Institute、ボストン、マサチューセッツ、米国) を、ウェルシュ菌からのノイラミニダーゼで処理する (37℃で2時間、ノイラミニダーゼの1酵素単位/10⁶細胞)。

免疫後、上記の文献に記載の方法でさらに処理を行う。細胞系P3X63-Ag 8.653の細胞を融合相手として用いる。

融合細胞を培養して、クローニングして、クローンを再び培養する。産生された抗体を、間接免疫蛍光法によって未処理およびノイラミニダーゼ処理SW2細胞

の結合を調べる。抗体が骨髄からの細胞または白血球と反応しない細胞系を選

択する。免疫蛍光検査のために、 2×10^5 個の細胞（腫瘍、骨髄または血液細胞）をそれぞれ試験管に分注して、0.1%アジ化ナトリウムを加えたPBS $25 \mu\text{l}$ 中の 10^{-7}M の被検抗体とともに 4°C で1時間インキュベートする。細胞を洗浄して、フルオレセイン標識した抗マウス抗体（ヤギ）を含む $50 \mu\text{l}$ の溶液で処理して、再び洗浄する。抗体の細胞への結合を蛍光によって検出することができる。

このようにして単離した抗体をSEN7と称する。テストスティック（アメルシャム、英国）を用いる試験が示すように、これはアイソタイプIgG1/ κ に属する。

[実施例2]

抗体SEN7の産生および精製

細胞系SEN7. 2a. 4の細胞を、ホローファイバーシステム（アクシスト、テクノマラ、スイス）で10%（v/v）ウシ胎児血清および2mM L-グルタミンを加えたRPMI 1640培地中で培養する。抗体を、プロテインAカラム（BIO-RAD、リッチモンド、カリフォルニア州、米国）上に培養上清から吸着させる。このために、培養上清を3.3M N

aClを含む50mMトリス塩酸（pH8.9）中でカラムに供して、次いで溶出液にタンパク質がなくなるまで3.3M NaClを含む50mMトリス塩酸（pH8.9）で洗浄する。結合したIgG抗体を150mMのNaClを含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）で溶出する。溶出液を25mMの酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）に対して透析して、イオン交換カラム（モノーS（登録商標）、ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン）に供し、NaCl勾配を用いて溶出する。

このようにして得られた抗体調製物は、SDS-PAGEおよび等電点集束法によって均一であることが証明された。

[実施例3]

抗体SEN7のアイソトープ標識

^{125}I で標識するために、 $40 \mu\text{g}$ のIodoGen（登録商標、Pierce、英

国) を $50 \mu\text{l}$ のクロロホルムに溶解する。溶液を 1.5 ml の容器中で乾燥するまで濃縮する。 $100 \mu\text{g}$ のSEN7抗体の $50 \mu\text{l}$ のPBS溶液および $200 \mu\text{Ci}$ の ^{125}I ヨウ化物を含む溶液を、この容器に加える。反応混合物を5分間攪拌する。

次いで反応を $50 \mu\text{l}$ のチロシン (Fluka) 飽和PB

S溶液を加えることによって止める。SEPHADEX (登録商標) G-25を詰めたカラムをBSAのPBS溶液 (10 g/l) で平衡にして、タンパク質と結合していないヨウ素の分離に用いる。

TCA沈澱によって決定された標識タンパク質の放射化学的純度は、95%以上である。

ヨウ素アイソトープ ^{131}I を同様にして導入する。同じ反応を他の抗体 (例えばMG-1) の放射性標識誘導体の調製にも用いる。

[実施例4]

SEN7抗原のウェスタンブロット分析

ウェスタンブロット分析を、抗体SEN7によって認識される抗原を単離するために行う。肺の小細胞癌腫に由来し、抗体SEN7と反応する細胞系OH3を、抗原源として用いる。

10^7 個の細胞を、 45 mM の3-[(3-コルアミドプロピル) ジメチルアンモニオ] プロパンスルホナート (CHAPS) および 0.1% NaN_3 および種々のプロテアーゼインヒビターの混合物 (0.1 mM の1, 10-フェナントロリン、 0.1 mM の3, 4-ジクロロイソクマリン、 0.05 mM のN-[N-(L-3-トランス-カルボキシラン-2-カルボニル) -L-ロイシル] アグマチン (E-64)、 $50 \mu\text{g}$

$/\text{ml}$ のペプスタチンAおよび 0.1 mg/ml のカルパインインヒビターペプチド) を添加してPBS中で 0°C で1時間抽出する。

このために、懸濁液をボルテックスミキサーで短時間混合する。次いで、遠心分離 (1時間、 $100000 \times g$) によって抽出物から細胞崩壊物を除去する。

抽出物を、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下でO' F a r r e lの緩衝液系中でポリアクリルアミドゲル(7.5%)電気泳動によって分離する。ゲルを、6M、3Mおよび1.5M尿素中で、次いで水中および移動緩衝液(pH10.5、10Mの3-[シクロヘキシルアミノ]-1-プロパンスルホン酸、10%メタノール)中でそれぞれ30分間再生させる。次いでタンパク質を電気泳動によってImmuno-Lite P膜(Bio-Rad、CH)に100Vhで移す。膜を、Johnson、D.A. et al、Gene Anal. Tech.、1、328-334、1984)に記述の方法で50g/Iの脱脂粉乳PBS溶液で前処理して、次いで 10^{-7} Mの濃度のアフィニティー精製SEN7とともに4℃で一晩インキュベートする。結合しなかった抗体を、0.5g/lのツイーン20のPBS溶液で洗い流す。ゲルを、アルカリホスファターゼと抱合させたヤギ抗マウスIgG溶液で処理する。洗浄後、発光物質とともにインキュベートすることによってX線フィルム上でバンドを可視化

する。

分子量180、000を有する単一タンパク質バンドが認められる。細胞系OH3の場合、このバンドは非還元条件下で存在する。一次抗体なしの陰性対照においてはこれは認められない。

[実施例5]

SEN7の結合定数の決定

1%ウシ血清アルブミンおよび0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSの100 μ lでSW2細胞の連続希釈を 10^7 個の細胞から始めて調製する。それぞれの希釈液を、40ngの実施例3によるアイソトープ標識抗体とともに4℃で2時間処理する。次いで、細胞を遠心分離して、遊離および細胞結合した抗体量を放射性活性を測定することによって決定する。

データ分析によって、抗体はアフィニティー定数 $K_a = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ で結合すること、および細胞あたり約200、000個の結合部位が存在することが確認される。

[実施例6]

抗体SEN7のNCAM-トランスフェクト細胞との反応

抗体SEN7の反応を、相補的DNAでトランスフ

ェクトさせておいた細胞で調べた。このcDNAは、小細胞気管支癌腫細胞系SW2からのヒトNCAM（神経細胞付着分子）の分子量140、000ダルトンのアイソ型をコードする。これらの安定したトランスフェクトされた細胞を、次のように調製した。

NCAMの140、000ダルトンのアイソ型のコード領域を、PCR法（ポリメラーゼ連鎖反応）によってcDNAからクローニングした。ヒト小細胞気管支癌腫細胞系SW2に由来するポリA+RNAからcDNAを合成した。三つのオーバーラップDNAフラグメントを調製して、次いでそれぞれをクローニングして、pSK+ブルースクリプト（Stratagen GMGH、チューリッヒ）において配列決定した。フラグメント1を制限酵素（EcoRI/NotI）によって切断して、切断片を単離した。フラグメント2をEcoRI/BstBIを用いて切断して単離した。フラグメント3をBstBI/NotIを用いて切断して単離した。これら三つの切断フラグメントを再連結して、ヒト140、000ダルトンNCAMのコード配列を得た。次いで、このクローンをHindIII/NotI制限酵素を用いて真核生物発現ベクターpRC/CMV（Invitrogen、ハイデルベルグ）中でサブクローニングした。

マウスプレーB細胞系B-300.19（Reth, et

al, Nature 322, 840-842, 1986）へのトランスフェクションを電気穿孔法によって行った。このために、40ngの未切断プラスミドを 10^7 個のマウス細胞に挿入した。次いでゲネチシン抵抗性の細胞を選択した。用いるベクターは、ゲネチシン抵抗性遺伝子を含む。抵抗性クローンをNCAMの表面発現について調べた。とくに高度の均質のNCAMの発現を有するクローンを選択した。

このクローンは、抗体SEN7および他の公知の抗NCAM抗体に関して陽性であった。このクローンは、抗クラスターw4/CD24抗体SWAIIに関して陰性であった。

〔実施例 7〕

抗体 S E N 7 と他の N C A M 抗体との競合

小細胞気管支癌腫上の三つの異なるエピトープ (Moolenaar, C. E. C. K. et al、Cancer Res. 50、1102-1106、1990およびHida, T. et al、Br. J. Cancer、63、Su±1. XIV、24-28、1991) を認識する N C A M 抗体を、気管支癌腫細胞への S E N 7 結合をブロックする作用について調べた。ラジオイムノ実験において、まず 10^5 個の細胞を過剰の競合一次 N C A M 抗体とともに処理した。

次いで、細胞を 125 I 標識抗体 S E N 7 (半飽和濃度を用いる) とともにインキュベートした。未結合抗体を洗浄除去して、結合している放射能を決定した。次の表 1 に示されるように、腫瘍細胞への結合の他の抗体の S E N 7 との競合は皆無かごく僅かであることが見出だされた。

表 1 : 放射性標識 S E N 7 抗体と無標識抗体との N C
A M a に対する小細胞気管支癌腫細胞における結合競
合

無標識抗体	S A M (c p m) b)	% 結合
無	1 3 8	1 0 0
S E N 7	1 5 8 8	1
<u>一次エピトープ</u>		
1 2 3 C 3	1 4 6 9	3 9
1 2 3 A 8	1 9 6 7	5 5
N C C - L u - 2 3 4	1 9 9 4	7 4
N K I - n b 1 - 3	2 3 5 2	8 7
S E N 3 6	1 6 5 6	1 2 6
<u>二次エピトープ</u>		
M O C - 2 1	2 2 1 4	6 8
N C C - L U - 2 4 6	1 6 4 4	7 8

N E 2 5	1 4 4 7	8 5
M O C - 1	1 6 6 8	1 0 3
<u>三 次 エ ピ ト ー プ</u>		
N K H 1	2 2 8 2	3 3
L e u 1 9	1 1 3 8	9 9

α> S E N 7 の 結 合 の 割 合 (%)

β> 一 次 (競 合) 抗 体 は ^{125}I 標 識 ヒ ヅ ジ 抗 マ ウ ス 抗 体
を 用 い て 定 量 し た。

[実施例8]

組織のイムノペルオキシダーゼ染色

腫瘍および健康組織の組織試料をイムノペルオキシダーゼ染色によって調べた。凍結切片 (5 μm 厚さ) を調製して接着剤で被覆したスライドに固定する。メタノール中の 0.3% (V/V) H_2O_2 およびブタ血清 (2%) による前処理の後、切片を S E N 7 溶液で被覆して、室温で1時間インキュベートする。次いで、切片を洗浄して、まずペルオキシダーゼ抱合抗マウスウサギ血清で、次いでペルオキシダーゼ抱合抗ウサギブタ血清で処理する。ペルオキシダーゼを、色原物質として 3, 3'-ジアミノベンジジンを用いて可視化する。切片をヘマトキシリンで逆染色する。結果を次の表2に要約する。

表 2

組 織 (試 料 数)	反 応
肺 の 小 細 胞 癌 腫 (7)	陽 性 (6 / 7)
類 癌 腫 (3)	陽 性 (2 / 3)
腺 癌 (3)	陰 性
乳 癌 腫 (4)	陰 性
結 腸 癌 腫 (4)	陰 性
腎 臓 癌 腫 (4)	陰 性
リ ン パ 腫 (1)	陰 性
皮 膚 (3)	陰 性
気 管 支 (4)	陰 性
肺 (3)	陰 性
腎 臓 (4)	陰 性
肝 臓 (3)	陰 性
リ ン パ 節 (3)	陰 性
脾 臓 (3)	陰 性
甲 状 腺 (5)	陽 性 (小 胞 細 胞)
副 腎 (3)	陽 性 (球 状 体 、 中 心 部)
骨 格 筋 (3)	陽 性 (個 々 の 繊 維)
辜 丸 (1)	陽 性 (ラ イ デ ィ ヒ 細 胞)
末 梢 神 経 (4)	陽 性 (軸 索)

骨 髄 (3)	陽 性
脳 (3)	陽 性 (神 経 網)
下 垂 体 (2)	陽 性 (後 葉 の 細 胞 お よ び 前 葉 の 各 細 胞)

[実施例9]

マウスにおける異種移植片の検査

調製： 10^7 個の細胞系SW2の洗浄細胞を、無病原菌条件下で飼育した雌ICR nu/nuマウス（4～6週令）にそれぞれ皮下注射する。腫瘍が約100mgの重量に達したら（注射後約2～3週間）直ちに、検査を始める。

方法：等量のSEN7抗体（ $6\mu\text{g}$ /動物、 $12\mu\text{Ci}$ を用いて ^{125}I -標識）と対照としてのMG-1抗体（ $6\mu\text{g}$ /動物、 $12\mu\text{Ci}$ を用いて ^{131}I -標識）の混合物を動物に静脈注射する。抗体SEN7と同様に対照抗体はクラスIgG1に属する。

それぞれ4匹のマウスを、2、4および7日後に殺して、種々の臓器をPBSで洗浄して、重量を測定する。二つの抗体を2チャンネルガンマカウンター（15～80keVおよび260～470keV）を用いて測定する。結果を次の表3に要約する。

表 3 :

	2 日	4 日	7 日
腫瘍 / 血液比	1.9	3.2	5.6
腫瘍 / 肝臓比	8.0	15.9	25.3
% 注射量 / g 臓器 ^{a)}			
腫瘍	19.3 ± 5.0	33.4 ± 10.3	10.1 ± 4.3
血液	10.2 ± 1.5	10.3 ± 2.8	1.8 ± 0.7
肝臓	2.4 ± 0.3	2.1 ± 0.9	0.4 ± 0.1
心臓	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.4	0.2 ± 0.1
肺	2.2 ± 0.4	1.4 ± 0.4	0.5 ± 0.3
腎臓	1.4 ± 0.4	1.2 ± 0.6	0.2 ± 0.0
脾臓	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.5	0.3 ± 0.1
筋肉	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.0
脳	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
骨	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.0


^{a)} 平均値 ± 標準偏差 (n = 3 または 4)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/02042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC5: C12P 21/08, C07K 15/00, A61K 39/395, G01N 33/574 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC5: C12P, C07K, A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CANCERLIT, MEDLINE, WPIL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Cancer Research, Volume 48, August 1988, Robert Waibel et al, "Tumor-associated Membrane Sialoglycoprotein on Human Small Cell Lung Carcinoma Identified by the IgG2a Monoclonal Antibody SWA20", page 4318 - page 4323, see esp. pages 4322-23 --	3,4
X	EP, A2, 0443599 (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT), 28 August 1991 (28.08.91) --	3,4
X	EP, A2, 0323802 (SANDOZ AG ET AL), 12 July 1989 (12.07.89), see esp. pages 6-7 --	3,4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 October 1993		23 -11- 1993
Name and mailing address of the International Searching Authority		Authorized officer
 European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		CARL OLOF GUSTAFSSON

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/02042

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, A2, 0356397 (SANDOZ-PATENT-GMBH ET AL), 28 February 1990 (28.02.90) --	3,4
X	Journal of Pathology, Volume 159, 1989, R.E. Kibbelaar et al, "expression of the embryonal neural cell adhesion molecule N-cam in lung carcinoma. Diagnostic usefulness of monoclonal antibody 735 for the distinction between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer", page 23 - page 28, see fig. 4 --	3,4
X	CHEST, Supplement, Volume 103, No 4, April 1993, Thomas J. Lynch Jr., "Immunotoxin Therapy of Small-Cell Lung Cancer." N901-Blocked Ricin for Relapsed Small-Cell Lung", page 436S - page 438S, see esp. page 438S --	3,4
X	Eur J Cancer, Volume 27, No 4, 1991, Robby E. Kibbelaar et al, "Neural Cell Adhesion Molecule Expression, Neuroendocrine Differen tiation and Prognosis in Lung Carcinoma", page 431 - page 435, see "Discussion" --	3,4
X	Cancer Research, Volume 50, February 1990, C.E. Kitty Moolenaar et al, "Expression of Neural Cell Adhesion Molecule-related Sialoglycoprotein in Small Cell Lung Cancer and Neuroblastoma Cell Lines H69 and CHP-212", page 1102 - page 1106, see esp. page 1105 --	3,4
P,X	Cancer Research, Volume 53, June 1993, Robert Waibel et al, "Monoclonal Antibody SEN7 Recognizes a New Epitope on the Neural Cell Adhesion Molecule Present on Small Cell Lung Cancer but Not on Lymphocytes" page 1-8 -- -----	1-8

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

01/10/93

International application No.

PCT/EP 93/02042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A2- 0443599	28/08/91	AU-A- 7125491 DE-A- 4005630 JP-A- 5030990	29/08/91 05/09/91 09/02/93
EP-A2- 0323802	12/07/89	JP-A- 2154694	14/06/90
EP-A2- 0356397	28/02/90	JP-A- 2219594	03/09/90

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 16/18		8318-4H	
C 1 2 N 5/10			
15/02			
15/09			
G 0 1 N 33/574	D	8310-2 J	
33/577	B	8310-2 J	
// A 6 1 K 39/00	H	9284-4C	
(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:91)			
		9281-4B	C 1 2 N 15/00 A